

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-330789
 (43)Date of publication of application : 19.11.2002

(51)Int.Cl. C12N 15/09
 C07K 14/075
 C12N 7/00
 // A61K 31/7088
 A61K 35/76
 A61K 38/00
 A61K 48/00
 A61P 35/00
 (C12N 7/00
 C12R 1:93)

(21)Application number : 2001-394376 (71)Applicant : HOKKAIDO TECHNOLOGY LICENCE OFFICE CO LTD
 (22)Date of filing : 26.12.2001 (72)Inventor : HAMADA HIROFUMI
 NAKAMURA TAKASHI

(30)Priority
 Priority number : 2000394521 Priority date : 26.12.2000 Priority country : JP

(54) ADENOVIRUS VECTOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an adenovirus having extremely weak infectivity to a normal cell, but having specific infectivity to a tumor cell and/or tissue of a specific type, and therefore capable of being used as a vector, and to provide a nucleic acid molecule for expressing the adenovirus, capable of making the adenovirus generate in the cell.

SOLUTION: This nucleic acid molecule for expressing the recombinant adenovirus comprises (i) a nucleic acid sequence encoding a modified fiber protein which is formed by connecting a fiber protein substantially not having binding ability to Coxsackie adenovirus receptor(CAR) with a molecule having specificity to the cell and/or tissue of the specific type and/or (ii) another nucleic acid sequence encoding another modified fiber protein which is formed by modifying the fiber protein substantially not having binding ability to CAR so as to have the specificity to the cell and/or tissue of the specific type.

LEGAL STATUS

- [Date of request for examination]
- [Date of sending the examiner's decision of rejection]
- [Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
- [Date of final disposal for application]
- [Patent number]
- [Date of registration]
- [Number of appeal against examiner's decision of rejection]
- [Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
- [Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-330789

(P2002-330789A)

(43)公開日 平成14年11月19日(2002.11.19)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト [*] (参考)
C 12 N 15/09	Z NA	C 07 K 14/075	4 B 0 2 4
C 07 K 14/075		C 12 N 7/00	4 B 0 6 5
C 12 N 7/00		A 61 K 31/7088	4 C 0 8 4
// A 61 K 31/7088		35/76	4 C 0 8 6
35/76		48/00	4 C 0 8 7

審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 21 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2001-394376(P2001-394376)	(71)出願人	800000024 北海道ティー・エル・オー株式会社 北海道札幌市北区北7条西2丁目8番地1
(22)出願日	平成13年12月26日(2001.12.26)	(72)発明者	濱田 洋文 北海道札幌市中央区宮ヶ丘2丁目1-30-602
(31)優先権主張番号	特願2000-394521(P2000-394521)	(72)発明者	中村 貴史 北海道札幌市中央区南14条西14丁目3-20-906
(32)優先日	平成12年12月26日(2000.12.26)	(74)代理人	100059959 弁理士 中村 稔 (外9名)
(33)優先権主張国	日本 (JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アデノウイルスベクター

(57)【要約】

【解決課題】 正常細胞に対する感染力が極めて弱く、特定のタイプの腫瘍細胞および/または組織に対して特異的に感染することを特徴とする、ベクターとして利用可能なアデノウイルスを提供すること。また、上述のアデノウイルスを細胞内で生じさせるためのアデノウイルス発現用核酸分子を提供すること。

【解決手段】 i) 実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質に特定のタイプの細胞および/または組織に対する特異性を有する分子を接続した改変ファイバータンパク質をコードする核酸配列、および/または、

ii) 実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質を特定のタイプの細胞および/または組織に対する特異性を有するように改変した改変ファイバータンパク質をコードする核酸配列、を含む組換えアデノウイルス発現用核酸分子である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 i) 実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質に特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子を接続した改変ファイバータンパク質をコードする核酸配列、および／または、
 ii) 実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質を特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有するように改変した改変ファイバータンパク質をコードする核酸配列、を含む組換えアデノウイルス発現用核酸分子。

【請求項2】 i) ヒトアデノウイルス40型のショートファイバーに特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子を接続した改変ファイバータンパク質をコードする核酸配列、および／または、
 ii) 特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有するように改変した改変ヒトアデノウイルス40型ショートファイバータンパク質をコードする核酸配列、を含む組換えアデノウイルス発現用核酸分子。

【請求項3】 特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子が、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(NG2)に結合する分子、インテグリンに結合する分子、ヘパラン硫酸に結合する分子、および、メラニン細胞刺激ホルモン(MSH)レセプターに結合する分子からなる群より選ばれる分子である、請求項1または2に記載の核酸分子。

【請求項4】 特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子が、SYSMEHFRWGKPV、ACDCRGDCFCG、7個のリジンが結合したポリリジンK7、TAASGVRSMHおよびLTLRWVGLMSからなる群より選ばれるペプチドである、請求項1～3に記載の核酸分子。

【請求項5】 CARとの結合能を有するファイバータンパク質をコードする核酸配列を実質的に含まない、請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸分子。

【請求項6】 ウィルス粒子を構成するファイバーとして、アデノウイルス40型ショートファイバーのみを有する組換えアデノウイルス粒子。

【請求項7】 請求項6に記載の組換えアデノウイルス粒子を生成するための組換えアデノウイルス発現用核酸分子。

【請求項8】 i) 実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質に特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子を接続した改変ファイバータンパク質、および／または、
 ii) 実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質を特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有するように改変した改変ファイバータンパク質、を含む組換えアデノウイルス粒子。

【請求項9】 i) ヒトアデノウイルス40型のショートファイバーに特定のタイプの細胞および／または組織に

対する特異性を有する分子を接続した改変ファイバータンパク質、および／または、
 ii) 特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有するように改変した改変ヒトアデノウイルス40型ショートファイバータンパク質、を含む組換えアデノウイルス粒子。

【請求項10】 特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子が、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(NG2)に結合する分子、インテグリンに結合する分子、ヘパラン硫酸含有レセプターに結合する分子、および、メラニン細胞刺激ホルモン(MSH)レセプターに結合する分子からなる群より選ばれる分子である、請求項8または9に記載の組換えアデノウイルス粒子。

【請求項11】 特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子が、SYSMEHFRWGKPV、ACDCRGDCFCG、7個のリジンが結合したポリリジン、TAASGVRSMHおよびLTLRWVGLMSからなる群より選ばれるペプチドからなる群より選ばれるペプチドである、請求項10に記載の組換えアデノウイルス粒子。

【請求項12】 ウィルスを構成するすべてのファイバータンパク質がCARとの結合能を実質的に有しない、請求項8～12のいずれか1項に記載のアデノウイルス粒子。

【請求項13】 実質的にCARとの結合性を有しないアデノウイルスファイバータンパク質に、特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子を結合させてなる改変アデノウイルスファイバータンパク質。

【請求項14】 特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子が、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(NG2)に結合する分子、インテグリンに結合する分子、ヘパラン硫酸含有レセプターに結合する分子、および、メラニン細胞刺激ホルモン(MSH)レセプターに結合する分子からなる群より選ばれる分子である、請求項13に記載のアデノウイルスファイバータンパク質。

【請求項15】 特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子が、SYSMEHFRWGKPV、ACDCRGDCFCG、7個のリジンが結合したポリリジン、TAASGVRSMHおよびLTLRWVGLMSからなる群より選ばれるペプチドである、請求項13に記載のアデノウイルスファイバータンパク質。

【請求項16】 請求項13～15のいずれか1項に記載のアデノウイルスファイバータンパク質をコードする核酸分子。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は特定の細胞および／または組織を標的とした遺伝子導入方法に適した組換え

アデノウイルスおよび、組換えアデノウイルスファイバータンパク質、および組換えアデノウイルス発現用核酸分子に関する。特に、本発明は、特定のタイプの腫瘍細胞および/または腫瘍組織を標的とする組換えアデノウイルス、組換えアデノウイルスファイバータンパク質および、組換えアデノウイルス発現用核酸分子に関する。

【0002】

【従来の技術】遺伝子治療は疾病の治療技術、特に腫瘍の治療技術としても注目されており、現在我が国を含めて世界中で盛んに研究が行なわれ、かつ臨床研究も行なわれている。遺伝子治療方法としては、単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼおよびガンシクロヴィルの組み合わせのようないわゆる「自殺遺伝子法」、IL-2などの免疫系を活性化する遺伝子の導入、p53等の癌抑制遺伝子の導入、アンチセンス遺伝子の導入などが知られており、これらの方に使用できる遺伝子およびベクターの開発も進められている。しかしながら、治療としての遺伝子治療は現在もまだ発展段階にあり、遺伝子の導入効率、遺伝子導入の特異性、導入遺伝子の安定性、癌細胞の増殖抑制効果、導入遺伝子の安全性等の点について更なる改良が望まれている。特に、導入効率が高く、標的細胞以外には遺伝子がほとんど導入されない特異性の高い遺伝子導入方法が望まれている。

【0003】アデノウイルスは遺伝子導入のためのベクターとして、特に遺伝子治療の分野で関心が高い。アデノウイルスは二本鎖DNAをゲノムに持つ正二十面体構造をしたウイルスであることが知られている。アデノウイルスは血清学的に幾つかに分類されており、ヒトの遺伝子治療によく使用されるのはヒトアデノウイルス2型および5型である。アデノウイルスには、キャップシドと呼ばれる正二十面体の頂点にベースを、および末端にノブを持つ12本のファイバーが存在していることが明らかにされている。これらのファイバーはアデノウイルスの細胞への感染に必要であり、これらのファイバーと相互作用する細胞表面レセプターの存在が知られている。そのようなレセプターとしてCAR(コクサッキーアデノウイルスレセプター) (Coxsackie adenovirus receptor)が報告されている。実際、大部分のアデノウイルスは細胞への接着にCARを利用すると考えられている。

【0004】アデノウイルスは、正常細胞を含めて上述のCARを発現する多くの細胞タイプに感染できるため、ベクターとしての利用価値が高く評価されてきたが、一方でそのような宿主域の広さが大きな問題となっている。すなわち、アデノウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行なった場合には、標的細胞、例えば腫瘍細胞のみならず、周辺の正常細胞にも感染する可能性が高いという点が指摘されている。このような宿主域の広さという問題を解決するために、これまでに幾つかのアプローチが取られている。これらのアプローチは大きく分けて2通りに分類できる。第1のアプローチは、細胞特異的

レセプターに対するリガンドをアデノウイルス5型のファイバーに付加することにより効率の良い遺伝子導入を行なうことである。細胞特異的レセプターに対するリガンドをアデノウイルス5型のファイバーに付加する方法として、以下が試みられている：1) 遺伝子を改変してK7、K20(ポリリジン)、RGDなどのペプチドリガンドをウイルスゲノムに挿入する方法(Bouriら、Hum. Gene Ther. 10:1633-1640 (1999)、Yoshidaら、Hum. Gene Ther. 9:2503-2515 (1998)、Dmitrievら、J. Virology, 72:9706-9713 (1998))、2) PEG(ポリエチレングリコール)等により、化学的にリガンドを付加する方法(Romanzukら、Hum. Gene Ther. 10:2615-2626 (1999))、3) リガンド(EGFまたはEpCAMなど)とアデノウイルスファイバーを結合するタンパク質からなる二重特異性抗体によって、あるいは融合タンパク質として、リガンドを付加する方法(Dmitrievら、J. Virology 74:6875-6884 (2000))。特に3)の場合、二重特異性抗体または融合タンパク質はアデノウイルスレセプターであるCARの認識に機能しているファイバー部位(CARとの結合部位)に結合するため、CARを介した感染も同時に成立しない。第2のアプローチは、アデノウイルス5型ベクターがもっている広宿主性を除去し、宿主域を狭めることである。これまでに、遺伝子を改変して2型または5型ファイバーから、3型、7型、または17型のファイバーに変換することによって、宿主域が改変されたことが報告されている(Krasnykhら、J. Virology 70:6839-6846 (1996)、Seqgernら、J. Virology 74:354-362 (2000)、Chillonら、J. Virology 73:2573-2540 (1999)、Stevensonら、J. Virology 71:4782-4890 (1997)、Galら、J. Virology 70:2116-2123 (1996))。

【0005】しかしながら、ファイバータンパク質を改変して充分な特異性を実現しようする場合には、改変の結果、活性のあるウイルス粒子が形成されない場合があることが指摘されており、更には期待通りの特異性が現れない場合があることも報告されている(Wickmanら、J. Virol. 71 (11) 8221-8229 (1997))。実際、Wickmanらは、ラミニンレセプターと結合するモチーフ配列やインテグリンと結合するモチーフ配列をアデノウイルスファイバーのC末端に挿入したベクターを作製したが、それらは期待される特異的結合を示さなかったことを報告している。このように、アデノウイルスファイバータンパク質の改変によって、特異性を制御する試みは様々にわたって行われているものの、その結果は多岐にわたっており必ずしも成功しておらず、有効な手法が未だ確立されていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、特定の細胞および/または組織に対して特異的に感染することを特徴とする、ベクターとして利用可能なアデノウイルスを提供することを目的とする。より具体的には、本発明

は、正常細胞に対する感染力が極めて弱く、特定のタイプの腫瘍細胞および／または組織に対して特異的に感染することを特徴とする、ベクターとして利用可能なアデノウイルスを提供することを目的とする。また、本発明は、上述のアデノウイルスを細胞内で生じさせるためのアデノウイルス発現用核酸分子を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】アデノウイルスは、正常細胞を含め、CAR（コクサッキーアデノウイルスレセプター）を発現している多くの細胞種に感染し得るが、遺伝子治療ベクターとして利用する場合には前述したように宿主域の広さが問題となっていた。また、宿主域を変える、あるいは特定の型の細胞に対して特異性を付加する等の試みが行なわれてきたことは既に述べたが、なお、アデノウイルスが本来的に持っている宿主域の広さは依然として残っていた。そこで、本発明者らは、一部のアデノウイルスがCARに対する結合能が著しく低く、実質的にCARを認識しない（実質的にCARとの結合能を有しない）ファイバーを天然に有していることに着目し、本発明を完成するに至った。

【0008】なお、本明細書において、「アデノウイルス」と「アデノウイルス粒子」は互換的に使用され、野生型または組換えアデノウイルス粒子を意味する。また、本明細書において、「組換えアデノウイルス発現用核酸分子」の語は適切な宿主細胞内でアデノウイルス粒子を生じさせるために必要な配列を有する核酸分子をいう。従って、組換えアデノウイルス発現用核酸分子は、アデノウイルスを生じさせるために必須の配列の他、外来性遺伝子を含んでいてもよい。ベクターとして利用される「アデノウイルス」または「アデノウイルス粒子」はキャップシド内に自身のゲノムとして前述のような組換えアデノウイルス発現用核酸分子を有する組換えアデノウイルス粒子である。

【0009】従って、本発明は、

- i) 実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質に特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子を接続した改変ファイバータンパク質をコードする核酸配列、および／または、
- ii) 実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質を特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有するように改変した改変ファイバータンパク質をコードする核酸配列、を含む組換えアデノウイルス発現用核酸分子である。

【0010】また、本発明は、

- i) ヒトアデノウイルス40型のショートファイバーに特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子を接続した改変ファイバータンパク質をコードする核酸配列、および／または、
- ii)) 特定のタイプの細胞および／または組織に対する

特異性を有するように改変した改変ヒトアデノウイルス40型のショートファイバータンパク質をコードする核酸配列、を含む組換えアデノウイルス発現用核酸分子である。また、本発明は、更にウイルスを構成する全てのファイバータンパク質がCARとの結合能を実質的に有しないアデノウイルスをコードするアデノウイルス発現用核酸分子である。

【0011】特に、本発明は、CARとの結合能を有するファイバータンパク質をコードする核酸配列を実質的に含まず、CARとの結合能を有しないファイバータンパク質に、NG2（コンドロイチン硫酸プロテオグリカン）に結合する分子を接続した改変ファイバータンパク質、インテグリンに結合する分子を接続した改変ファイバータンパク質、ヘパラン硫酸含有レセプターに結合する分子を接続した改変ファイバータンパク質、および、メラニン細胞刺激ホルモン（MSH）レセプターに結合する分子を接続した改変ファイバータンパク質をコードする核酸配列を含む、組換えアデノウイルス発現用核酸分子である。特に本発明は、実質的にCARとの結合能を有しない

- 10 ファイバータンパク質がヒト40型アデノウイルス由来である、前記組換えアデノウイルス発現用核酸分子である。
- 20 【0012】また、本発明は、ウイルスを構成するすべてのファイバータンパク質がCARに対する結合能を実質的に有しない、組換えアデノウイルス粒子である。

【0013】さらに、本発明は、
i) 実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質に特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子を接続した改変ファイバータンパク質、および／または、

- 30 ii) 実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質を特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有するように改変した改変ファイバータンパク質を含む、組換えアデノウイルス粒子である。

【0014】特に、本発明は、

- i) ヒトアデノウイルス40型のショートファイバーに特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子を接続した改変ファイバータンパク質、および／または、
- 40 ii)) 特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有するように改変した改変ヒトアデノウイルス40型のショートファイバータンパク質を含む、組換えアデノウイルス粒子である。また、本発明は、上述の改変ファイバータンパク質を有するという性質に加えて、CARとの結合能を有するファイバータンパク質を実質的に含まないことをも特徴とする組換えアデノウイルス粒子である。

【0015】更に具体的には、本発明はまた、ウイルスを構成するタンパク質として、CARとの結合能を有する
50 ファイバータンパク質を実質的に含まず、実質的にCAR

との結合能を有しないファイバータンパク質に、NG2（コンドロイチン硫酸プロテオグリカン）に結合する分子を接続した改変ファイバータンパク質、インテグリンに結合する分子を接続した改変ファイバータンパク質、ヘパラン硫酸含有レセプターに結合する分子を接続した改変ファイバータンパク質、および、メラニン細胞刺激ホルモン（MSH）レセプターに結合する分子を接続した改変ファイバータンパク質を含む、組換えアデノウイルス粒子である。特に本発明は、実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質がヒト40型アデノウイルス由来である組換えアデノウイルス粒子である。

【0016】さらに、本発明は、実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質に特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子を接続した改変ファイバータンパク、実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質を特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有するように改変した改変ファイバータンパク質、およびそれらをコードする核酸分子である。

【0017】より具体的には、ヒトアデノウイルス40型のショートファイバータンパク質にNG2（コンドロイチン硫酸プロテオグリカン）レセプターに結合するペプチドを結合した改変ファイバータンパク質、インテグリンに結合するペプチドを結合した改変ファイバータンパク質、ヘパラン硫酸含有レセプターに結合する分子を接続した改変ファイバータンパク質、メラニン細胞刺激ホルモン（MSH）レセプターに対するリガンドを結合した改変ファイバータンパク質、および、それらをコードする核酸分子である。

【0018】

【発明の実施の形態】本発明に利用できるウイルスは、アデノウイルス科に属するウイルスであり、アデノウイルス5型、ヒトアデノウイルス2型等のヒトアデノウイルスが好ましく、特にヒトアデノウイルス5型およびヒトアデノウイルス2型が好ましい。本発明に利用できる組換えアデノウイルス発現用核酸分子は、野生型アデノウイルスゲノムあるいは遺伝子治療等に従来使用されてきた組換えアデノウイルスのゲノムを基礎としてこれを改変することによって作製することができる。例えば、従来から遺伝子治療に使用してきたアデノウイルスとしてE1AおよびE1B領域を消失させた、通常は細胞内で増殖し得ない組換えアデノウイルスが知られているが、このようなアデノウイルスは本発明に適したものである。このような欠損アデノウイルスは、その増殖に必要な因子を細胞内でtransに供給した場合にのみ新たなウイルス粒子を生成することができる。本明細書において、本発明の組換えウイルスを増殖させるための適切な宿主細胞とは、そのような因子を供給し得る細胞を言う。

【0019】本発明の組換えアデノウイルス発現用核酸分子から生じ得るアデノウイルスは、野生型アデノウ

10 ルスに対する主要なレセプターであるCARとの結合能を実質的に有しないファイバータンパク質に特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子を接続した改変ファイバータンパク、および／または、実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質を特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有するように改変した改変ファイバータンパク質を有する組換えアデノウイルスである。ここで、「実質的にCARとの結合能を有しない」あるいは「実質的にCARとの結合能を有しない」とは、CAR介在性の感染をすることが知られているウイルスの感染に対する競合阻害実験（例えば、Kasonoら、Clin. Cancer. Res. 5 (9) 257 1-2579 (1999)に記載されるような阻害実験）において、20%以下、好ましくは15%以下、更に好ましくは10%以下の阻害能しか有しないことをいう。また、「CARとの結合能を有するファイバータンパク質をコードする核酸配列を実質的に含まない核酸分子」とは、その核酸分子に含まれる配列によってコードされる全てのファーバータンパク質が上述した意味で実質的にCARとの結合能を有しないことを意味する。実質的にCARとの結合能を有しないファイバータンパク質としては、ヒト40型アデノウイルスのショートファイバータンパク質等が知られており、このショートファイバータンパク質は本発明の組換えアデノウイルスおよび本発明の組換えアデノウイルス発現用核酸分子を作製するために特に適している。

20 【0020】特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子としては、細胞表面上に存在する分子と特異的に相互作用する分子、例えば特異的レセプターのリガンドが好ましい。そのような分子としては、例えば、メラノーマのMSH（メラニン細胞刺激ホルモン）レセプターと結合する分子、インテグリンレセプターと結合する分子、ヘパラン硫酸含有レセプターに結合する分子、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンNG2レセプターと結合する分子があげられる。例えば、MSH（メラニン細胞刺激ホルモン）レセプターと結合する分子としてSYSMEHFRWGKPVを含むペプチド、インテグリンレセプターと結合する分子としてRGD(Arg-Gly-Asp)モチーフを含む分子、ヘパラン硫酸含有レセプターに結合する分子としてポリリジンを含む分子、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンNG2レセプターと結合する分子としてTAA(Thr-Ala-Ala)を含む分子またはLTLRWGLMSを含む分子が好ましい。中でも、SYSMEHFRWGKPV、ACDCRGDCFCG、7個のリジンが結合したポリリジンK7、TAASQVRSMHおよびLTLRWGLMSが特に好ましい。SYSMEHFRWGKPVはメラノーマ細胞に対して、RGDモチーフは頭頸部癌、内皮細胞、平滑筋細胞等に対して、K7はマクロファージ、内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、T細胞に対して、TAA SGVRSMHおよびLTLRWGLMSはメラノーマ、脳腫瘍細胞等に対して、それぞれ親和性が高いためこれらの細胞を標的とする場合にそれぞれ適している。

30 40 50

【0021】これらの分子は、一般にアデノウイルスのファイバーを構成するノブ部分に接続するのが好ましい。両者を結合させる位置は特に限定されないが、標的細胞の認識の際、すなわち、標的細胞表面上の分子との結合の際に立体障害の生じない位置が好ましく、例えば、ノブ部分のHILループ領域あるいはファイバータンパク質のC末端がより好ましい。これらの分子はファイバータンパク質に直接接続させることもできるが、結合の立体障害等を回避するためにリンカーを介して接続するのが好ましい。リンカーとしては、所望の特異性を損なわない限りどのようなものであってもよいが、1～100残基程度のオリゴペプチドが好ましく、1～20残基程度のオリゴペプチドが特に好ましい。リンカーの種類および長さは、必要に応じて変更してよく、最適なリンカーの長さはそれぞれの場合について、in vitro感染実験等によって決定することができる。本発明の実施態様の一つにおいては、Lysアミノ酸からなるペプチドがリンカー（「ASリンカー」と記載される）として使用される。特定のタイプの細胞および／または組織に対する特異性を有する分子、例えば、前述のようなリガンドをファイバータンパク質あるいはリンカーに結合させる場合は、標的細胞／組織との結合性を失わない限り、前記特異性を有する分子のいずれの位置で結合させてもよい。即ち、前記分子のN末端、C末端、あるいは内部のいずれの位置で結合させてもよい。

【0022】本発明の組換えアデノウイルス発現用核酸分子は、この分野で良く知られた分子生物学的手法によって作製することができる。例えば、一般的な分子生物学的手法については、Sambrookら、1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, F.M. Ausubelら編集、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994)、PCR Technology: Principles and Application for DNA Amplification, H. Erlich編集、Stockton Pressなどを参照することができる。また、組換えアデノウイルスの作製のためには、ウイルスゲノムの両端に共有結合した末端タンパク質を保持したままのゲノム-末端タンパク質複合体（以下DNA-TPCと略す）を用いる方法、例えばYoshidaらの方法（Yoshidaら、Hum. Gene Ther. 9:2503-1515 (1998)）を利用することができます。これらの手法はいずれも当業者に良く知られたものである。典型的な作製方法においては、まず、pAxCw、pAxCw等のコスミドカセットに目的とする遺伝子を組み込んだコスミドを作製する。一方、ウイルスからDNA-TPCを調製し、適当な制限酵素で切断しておく。次に、前述のコスミドおよび制限酵素処理したDNA-TPCを適切な宿主細胞、例えば293細胞にコトランスクレーションする。その後適当な条件で一定期間培養し、培養液中にウイルス粒子として放出された組換えアデノウイルス粒子

を回収することができる。

【0023】本発明の組換えアデノウイルス粒子は前述のように本発明の組換えアデノウイルス発現用核酸分子を適切な培養細胞にトランスクレーションし、その細胞を更に培養し、培養上清を回収することによって多重に調製することができる。必要であれば、回収したアデノウイルスを更に適切な宿主細胞で必要な回数だけ継代することによって更に大量のアデノウイルベクター粒子を調製することができる。アデノウイルスの増殖および回収のために適した細胞、トランスクレーションの条件、トランスクレクトした細胞の培養条件および培地等は当業者に良く知られたものである。例えば、通常よく使用されるE1A、E1B領域に欠損のあるアデノウイルスを増殖させる場合には、恒常にE1A、E1Bを発現している293細胞等を使用すればよい。更に、必要に応じて、塩化セシウムの濃度勾配遠心法を用いて濃縮精製することもできる。濃縮することにより、10³～10⁴粒子/ml程度の高力価のウイルス液を得ることができる。

【0024】本発明の組換えアデノウイルス発現用核酸分子は、外来遺伝子を組み込むことができ、組み込まれた外来遺伝子を効率的に標的細胞に導入することができる。本発明の組換えアデノウイルス発現用核酸分子に組み込む外来遺伝子としては、直接または間接的に標的細胞に対して細胞毒性を示すような分子をコードする遺伝子、細胞増殖因子、細胞増殖抑制因子、アポトーシス制御遺伝子、癌抑制遺伝子、細胞周期調節遺伝子、免疫調節遺伝子等が挙げられる。更に、非毒性のプロドラッグと組み合わせて使用するための自殺遺伝子を組み込むことも可能である。そのような組み合わせとしては、単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ(HSVtk)とガンシシクロビルの組み合わせ (HSVtk/GCV)、シトシンデアミナーゼと5-フルオロシトシンの組み合わせ (CD/5F)、ウラシルホスホリラーゼと5-フルオロウラシルの組み合わせ(UP/5FU)、HSVtkとUPを組み合わせた系 (UPTK/5FU+GCV) が挙げられる。このような外来遺伝子は、一般にはアデノウイルスゲノムのE1領域および／またはE3領域と置換され、またはこの領域に挿入される。

【0025】本発明のウイルスベクター粒子は医薬組成物の成分の一つとして治療、特に腫瘍の治療のために使用することができる。本発明の組換えアデノウイルス粒子を治療のために使用する場合は、単独で使用してもよいが、一般には製薬的に許容できる担体と共に使用される。そのような担体としては、水、生理食塩水、グルコース、ヒトアルブミン等の水性等張溶液が好ましい。更に、製薬的に通常使用される添加剤、保存剤、防腐剤、衡量等を添加することもできる。そのように調製した医薬組成物は、治療すべき疾病に依存して適切な投与形態、投与経路によって投与することができる。投与形態としては、例えば、乳剤、シロップ剤、カプセル、錠剤、顆粒剤、注射剤、軟膏等が挙げられる。本発明のウ

イルスペクター粒子またはこれを含む医薬組成物を治療のために投与する場合は、通常成人一人当たり1回に10³～10⁴個のウイルス粒子を投与するのが好ましいが、疾病の状態や標的細胞・組織の性質によって変更してもよい。投与回数は、1日1回～数回でよく、投与期間は1日～数ヶ月以上にわたってもよく、1～数回の投入を1セットとして、長期にわたって断続的に多数セットを投与してもよい。また、本発明のウイルスペクター粒子またはウイルスペクター核酸分子は、特定の細胞および/または組織の検出、または疾病状態の診断に使用することができます。例えば、特定の腫瘍細胞、例えば、メラノーマや脳腫瘍細胞を標的とした本発明のウイルスペクター核酸分子に検出可能なマーカー遺伝子を組込み、これを適切な宿主細胞にトランسفエクションして得られた本発明のウイルスペクター粒子は腫瘍細胞を検出診断するために使用することができる。

【0026】

【実施例】実施例1. ヒト40型アデノウイルスのロングファイバー(40L)およびショートファイバー(40S)の両方をコードするプラスミドの作製

ヒト40型アデノウイルス(Ad40)の長いファイバーと短いファイバーの2種類のファイバー(40F)をコードするDNA配列を含むプラスミドp40BamHI-A(理化学研究所登録番号: 1257)のPacI-MluI断片を除去後、PacI、MluI部位を平滑末端にしてMluIリソームカーソルを挿入した。次いでEcoRI断片を消失させた後、EcoRI切断部位を平滑末端にしてSalIリソームカーソルを挿入し、プラスミドpUC18+Ad40Fを得た(図1)。

* 錄RDB No. 1257)のPacI-MluI断片を除去後、PacI、MluI部位を平滑末端にしてMluIリソームカーソルを挿入した。次いでEcoRI断片を消失させた後、EcoRI切断部位を平滑末端にしてSalIリソームカーソルを挿入し、プラスミドpUC18+Ad40Fを得た(図1)。

このプラスミドは、ヒト40型アデノウイルスのロングファイバー(40FL)およびショートファイバー(40FS)の両方をコードしている。

【0027】実施例2. F40S(ヒト40型ショートファイバー)をコードするプラスミドの作製

アデノウイルス40型のショートファイバーをコードする遺伝子領域の一部を...pSKII+6.7R-2t/40Fテンプレートとし、配列番号2および配列番号3に記載の配列を有するプライマーを用いて、PCRにより合成した(図2)。

このPCR産物をBstXIとBamHIで消化し、pSKII+6.7R-2t/40FのXbaI-BstXI断片(1637bp)と共に、pSKII+6.7R-2t/40FのXbaI-BamHI領域にクローニングしてpSKII+6.7R-2t/40Sを得た(図3)。

使用したプライマー:

5'-CCCGAATTCCGTACCCCCCTCCAATTCACAATAACGGACCCATT-3' (配列番号2)

5'-CGCCGATCCTTATTGTTAGTTATGTACCAAAATAC-3' (配列番号3)

<配列表フリーテキスト>

配列番号2、3: PCRプライマー

【0028】更に、pSKII+6.7R-2t/40SのXbaI-BamHI断片(1863bp)を切り出してpWE6.7R-F/wt-2(Yoshidaら、1999)のXbaI-BamHI領域へクローニングしてpWE6.7R-40Sを得た(図4)。このpWE6.7R-F/wt-2は以下のように構築した。コスミドpWE15(GenBankアクセス番号M9569)はClontech社(Palo Alto, CA, USA)から購入した。pSKII+6.7R-K20(Yoshidaら、Hum. Gene Ther. 9:2503-2515 (1988))をSacIIで消化し、T4DNAポリメラーゼで平滑化して、ここに新たに合成したリン酸化BstBIリソームカーソルを挿入した。続いて、EcoRIおよびBstBIで消化

* し、Ad5アデノウイルスゲノムを含むEcoRI-BstBI断片を切り出し、pWE15のEcoRI-ClaI領域にクローニングしてプラスミドpWE6.7R-F/K20を得た。次に、pWE6.7R-F/K20をテンプレートとし、配列番号4および配列番号5に記載の配列を有するプライマーを用いてPCRによりAd5アデノウイルスのゲノムDNAをコードする領域を増幅した。得られたPCR産物をXbaIおよびKpnIで消化し、pWE6.7R-F/K20のK20変異をコードする配列を含むXbaI-KpnI断片に入れ換えることによってpWE6.7R-F/wt-2を得た。

【0029】

使用したプライマー:

5'-CGGAATTCTCGAGTTACACTTTTACATACATTGCCAAGATAACGATCCACCGGTGTCGACAAGATAAAAGAACGTTGTT-3' (配列番号4)

5'-CGGAATTCCGTACCCCCGAGCTGGTAATTAC-3' (配列番号5)

<配列表フリーテキスト>

配列番号4、5: PCRプライマー

【0030】次にプラスミドpUC-4K(Pharmacia社)をBamHIで消化し、カナマイシン耐性遺伝子を含むBamHI断片(1264bp)を切り出し、T4 DNAポリメラーゼで末端を平滑化して、pAx-cw [Miyakeら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1320-1324 (1996)]のSwaI部位にクローニングしてpAxKMを得た。pAxKMのAd5ゲノムを含むEcoRI断片

(約25770bp)を、pWE6.7R-40SのEcoRI部位にクローニングした。Ad5のゲノム配列が正しい方向に接続されているものを選択してコスミドpWEAxKM-F/40Sを得た(図4)。

【0031】実施例3. F40のノブ部分を有するヒト5型アデノウイルスファイバー(F/540S)をコードするブ

ラスミドの作製

アデノウイルス5型のファイバーをコードする遺伝子領域を有するプラスミドpSKII+wt2をテンプレートとし、配列番号6および配列番号7の配列を有するプライマーを用いて、PCRにより、アデノウイルス5型ファイバー*

使用したプライマー：

5'-GGCCCTTACTTGTACAGC-3'

(配列番号6)

5'-GATAGACCATATCGTTACCTTATCATTATTTT-3'

(配列番号7)

5'-TCACTACCATACTGGCTATCTCCCTACCC-3'

(配列番号8)

5'-CCCGATCCTTAATGCTAGTTATGACAAAATAC-3'

(配列番号9)

<配列表フリーテキスト>

配列番号6～9：PCRプライマー

【0032】前者のPCR産物をHindIIIおよびNdeIで消化し、後者のPCR産物をNdeIおよびBamHIで消化し、これらと一緒にしてpSKII+wt2のHindIII-BamHI領域へクローニングしてpSKII+540FS(NdeI)を得た(図7)。なお、pSKII+wt2は、実施例2で作製したpWE6.7R-F/wt-2のXbaI-BamHI断片をpBluescript SKII+(Stratagene)のXbaI-BamHI領域へクローニングして作製した。

【0033】次に、pSKII+540FS(NdeI)のXbaI/BamHI断片をpWE6.7R-40SのXbaI-BamHI領域へクローニングしてプラスミドpWE6.7R-540S(NdeI)を得た(図8)。実施例1と同様に、pAxKMのAd5ゲノムDNA配列を含むEcoRI断片(約25770bp) pWE6.7R-540S(NdeI)のEcoRI部位にクローニングし、Ad5のゲノムが正しい方向に挿入されたクローンを選択することにより、コスミドpWEAxKM-F/540S(NdeI)を得た(図8)。

* 使用したプライマー

5'-CCCCAATTCAAGATCTCCATCAGCCCTCCGCATCTCCTTCC-3'

(配列番号11)

5'-CGGAATTCAATGCCCATGTTAACAGAGGT-3'

(配列番号12)

<配列表フリーテキスト>

配列番号10：リガンド結合用リンカー

配列番号11、12：PCRプライマー

【0035】実施例5、NG2レセプターに対するリガンドを接続した改変ファイバー(F/40S-TAA)をコードするプラスミドの作製

pNEBasMSH α をテンプレートし、NG2レセプターに結合するアミノ酸配列TAASQVRSMH(TAA配列)(Burg MAら、Cancer Res. 59: 2869-2874 (1999)) (配列番号13)をコードする塩基配列を含むプライマー(配列番号14)お★40

使用したプライマー：

5'-CGAGATCTGGTTCAAGGCACTGGATCCGATCTACAGCTGCAAGTGGTGTCGAAGTATGCACTAAGTCG

(配列番号14)

5'-CTGTCCAACCTGGGTTCTCAAC-3'

(配列番号15)

<配列表フリーテキスト>

配列番号14、15：PCRプライマー

【0036】更に、pNEB/TAAのBamHI-AfII断片をpWE6.7R-40S/MSH α のBamHI-AfII領域へクローニングしてpWE6.7R-40SasTAAを得た。pAxKMのAd5のゲノムを含むEcoRI(約25770bp)をpWE6.7R-40SasTAAのEcoRI部位へクロー

ニングして、Ad5のゲノムが正しい方向につながっているものを選択することにより、コスミドpWEAxKM-F40SasTAAを得た(図10)。

※ 【0034】実施例4、メラニン細胞刺激ホルモンレセプターのリガンドを接続した改変ファイバー(F/40S-MSH)をコードするプラスミドの作製

pNEBasMSH α のBamHI-AfII断片をpWE6.7R-40SのBamHI-AfII部位へクローニングしてプラスミドpWE6.7R-40S/MSH α を得た(図9)。pNEBasMSH α は以下のように作製した。ASリンカー(PSASASASAPG: 配列番号10)を介して α MSHリガンドのアミノ酸配列がF40Sに続く構造を有する改変ファイバータンパク質をコードするpWE6.7R-F/asMSH α をテンプレートとして、配列番号11および配列番号12の配列を有するプライマーを用いてPCRによって、前述の改変ファイバータンパク質をコードする領域を増幅した。得られたPCR産物をBqIIとEcoRIで消化し、pNEB193(NEB社)のBqII-EcoRI領域へクローニングしてプラスミドpEBasMSH α を得た。

20

★ より配列番号15のプライマーを用いて、PCRによってNG2レセプターに対するリガンドを接続した改変ファイバー(F/40S-TAA)をコードするDNA分子を合成した(図9)。このPCR産物をBqIIとAfIIで消化し、pNEBasMSH α のBqII-AfII領域へクローニングしてプラスミドpNEB/TAAを得た(図9)。

50

【0037】実施例6、インテグリンと結合する分子を

接続した改変ファイバータンパク質(F/40S-RGD)およびヘパラン硫酸レセプターと結合する分子を接続した改変ファイバータンパク質(F/40S-K7)をコードするプラスミドの作製

pNEBasMSH α をテンプレートとし、ペプチドACDCRGDCFCG(RGD配列)(Wickman T Jら、J. Virol. 71:8221-8229(1997)) (配列番号16)をコードする塩基配列を含むプライマー(配列番号17)と配列番号15のプライマーを用いてRGD配列を接続した改変ファイバータンパク質*

使用したプライマー:

5'-CTGTCCAACCTGGCGTTGGTCAAC-3'

5'-CGAGATCTCGTTCTGGATCTGGATCCGGATCTGCCCTGTGACTGCCCGGAGACTGTTCTGTGGT

TAAGTCGACAAGAATAAAAGAACATCG-3'

5'-CGAGATCTCGTTCAAGCAGTGGATCCGGATCTAAAAAGAAGAAAAGAAGAAGTAAGTCGACAAG

AATAAAAGAACATCG-3'

<配列表フリーテキスト>

配列番号17、18: PCRプライマー

【0038】次に、pNEB/RGDまたはpNEB/K7のBamHI-AfI II断片をpNE6.7R-40S/MSH α のBamHI-AfI II領域にクローニングして、それぞれプラスミドpNE6.7R-40S/RGDおよびpNE6.7R-40S/K7を得た。pAxKMのAd5ゲノムを含むEcoRI断片(約25770bp)をpNE6.7R-40S/RGDまたはpNE6.7R-40S/K7のEcoRI部位にクローニングし、Ad5のゲノムが正しい方向に繋がっているものを選択することにより、コスミドpNEAxKM-F/40SasRGDおよびpNEAxKM-F/40SasK7を得た(図10)。

【0039】実施例7. レポーターlacZ遺伝子を発現する組換えアデノウイルスAxCAZ3-F/wtの調製

Yoshidaら(1998、上述)に記載されたプラスミドpCAZ2からlacZを含むAseI断片(末端を平滑化)約4890bpを、Promegaから購入したプラスミドpCIのBglII-SalI領域(末端を平滑化)へクローニングしてpCAZ3を得た。pCAZ3のBglII-BamHI断片約5150bpを単離し、末端を平滑化した後、コスミドpAx-cw(Miyakeら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 1320-1324 (1996))のSwI I部位にクローニングしてpAxCAZ3を得た。次に、pAxCAZ3 DNAおよびアデノウイルスAd5dIX(Miyakeら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 1320-1324 (1996))から単離したDNA-TPCをEcoRIおよびAseIで消化したDNA断片とを293細胞に共トランスクレクションすることにより、大腸菌lacZレポーター遺伝子発現カセットを持つ組換えアデノウイルスAxCAZ3-F/wtを得た。この組換えアデノウイルスアデノウイルス5型の野生型ファイバーを有し、宿主細胞中で β ガラクトシダーゼを発現することができる。

【0040】実施例8. レポーターlacZ遺伝子を発現する、F/40S-TAA改変ファイバー型組換えアデノウイルスAxCAZ3-F/40SasTAAの作製

改変ファイバータンパク質F/40S-TAAを有する組換えアデノウイルスは以下のようになつた。組換えアデノウイルスAxCAZ3-F/wtからゲノムDNA-TPCを単離し、これを

*をコードするDNA分子をPCRにより合成した。同様にして、7個のリジンからなるペプチド(K7)をコードする塩基配列を含むプライマー(配列番号18)および配列番号15のプライマーおよびpNEBasMSH α を用いて、K7を接続した改変ファイバータンパク質をコードするDNA分子を合成した。各PCR産物をBglIIおよびBamHIで消化し、それぞれpNEBasMSH α のBglII-AfI II領域にクローニングして、それぞれプラスミドpNEB/RGDおよびpNEB/K7を得た(図9)

(配列番号15:既述)

(配列番号17)

(配列番号18)

EcoRIおよびAseIで切断して得られた断片と、実施例5で得られたコスミドpNEAxKM-F/40SasTAAをClaIおよびPaciで切断して得られた断片とを293細胞へ共トランスクレクションした。トランスクレクションはMiyakeら(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 1320-1324 (1996))の方法に準じて行なつた。これは、F/K20変異体アデノウイルスの作製法としてYoshidaら(1998)(上述)に記載された方法と本質的に同じ方法である。但し、本実験においては、トランスクレクションした293細胞の96穴プレート中の巻き込み数をMiyakeら(1996)の方法に比して約30%とし、培養液のウシ胎仔血清(FBS)の濃度を10~5%まで低下させた。トランスクレクション後培養液を第4日、第8日、第15日にそれぞれ1ウェルに50 μ lずる適宜追加しながら3週間にわたって培養を続けたところ数十のブラークを分離することができた。これらのウイルスを293細胞に感染させて増幅させ、最終的に塩化セシウムの階段状勾配による簡便精製法(Kanegaeら、Jpn. J. Med. Sci. Biol., 47:157-166 (1994))により、10⁴粒子/mlの力価を有する組換えアデノウイルス液が得られた。また、同様にしてAxCAZ3-F/wtのDNA-TPCと実施例2および3で得られたコスミドpNEAxKM-F/40SまたはpNEAxKM-F/540S(NdeI)とをそれぞれ293細胞に共トランスクレクションすることにより、大腸菌lacZレポーター遺伝子発現カセットを有し、かつ、F/40SおよびF/540S(NdeI)のそれぞれの改変ファイバー型組換えアデノウイルスAxCAZ3-F/40SおよびAxCAZ3-F/540S(NdeI)を樹立した。これらは感染に関する陰性対照として使用した。これらのアデノウイルスは、ウイルスゲノムの解析結果からも、目的とする改変ファイバーを有するアデノウイルスであることが確認された。これらのウイルスを293細胞に感染させて増幅させ、塩化セシウムの段差の勾配による簡便精製法により、10⁴から10⁵粒子/mlの高力価をもつウイルス液を得た。

【0041】実施例9. レポーターlacZ遺伝子を発現する、F/40S-RGDまたはF/40S-K7改変ファイバー型組換えアデノウイルスAxCAZ3-F/40SasRGDおよびAxCAZ3-F/40SasK7の作製

実施例8と同様にして、実施例1で得られたコスミドpWE AxKM-F/40SasRGD又はpWEAxKM-F/40SasK7をそれぞれ293細胞に共トランسفエクトすることにより、大腸菌lacZレポーター遺伝子発現カセットを持ち、かつ、それぞれF/40S-RGDおよびF/40S-K7改変ファイバー型組換えアデノウイルスAxCAZ3-F/40SasRGDおよびAxCAZ3-F/40SasK7を樹立した。これらのアデノウイルスは、ウイルスゲノムの解析結果からも、目的とする改変ファイバーを有するアデノウイルスであることが確認された。これらのウイルスを293細胞に感染させて増幅させ、塩化セシウムの段差的勾配による簡便精製法により、 10^4 から 10^5 粒子/m1の高力価をもつウイルス液を得た。

【0042】実施例10. ヒトアデノウイルス40型のファイバー、またはヒトアデノウイルス40型ファイバーとヒト5型アデノウイルスファイバーとのキメラファイバー型組換えアデノウイルスの感染能

CARの発現が高いDLD-1(大腸癌)、HeLa(子宮頸癌)、HLF(肝癌)、A549(肺癌)培養細胞を6穴プレートにまき、翌日5,000、10,000粒子/細胞で野生型(wt)ファイバーを有するアデノウイルスAxCAZ3-F/wtおよび改変ファイバー型アデノウイルスAxCAZ3-F/40SL、AxCAZ3-F/40S、AxCAZ3-F/540S(NdeI)の感染を行ない、48時間後にマーカーであるLacZ遺伝子の発現をX-gal染色し、位相差顕微鏡で観察した。

【0043】その結果、F/wtおよびF/40SL型のアデノウイルスは、前述の4種類の細胞のいずれについても効率的に感染することが示された。一方、F/40S、F/540S型のアデノウイルスは4種の細胞のいずれについても感染がほとんど確認されなかつた。この結果により、40型のショートファイバーノブを有する改変ファイバー型のアデノウイルスはCARを介した感染は実質的に成立しないことがin vitro確認された。

【0044】次に、正常マウスの尾静脈より、 5×10^9 、 5×10^{10} 粒子のアデノウイルスAxCAZ3-F/wt、および改変ファイバー型アデノウイルスAxCAZ3-F/40SおよびAxCAZ3-F/540S(NdeI)を注入し、96時間後、肝臓の凍結切片においてマーカーであるLacZ遺伝子の発現をX-gal染色し、倒立顕微鏡で観察した。あるいは、 β -Gal ReporterGene Assay-Chemiluminescentキット(Roche)を用いて相対的化学発光量(RLU)を測定した。その結果、F/wt型アデノウイルスはCARの発現が高いことが知られている肝臓において効率良く感染することが示された。一方、F/40S、F/540S型アデノウイルスでは、F/wt型と比較して約10倍低い感染であり、 5×10^9 粒子では、感染がほとんど確認できなかつた。この結果により、in vivoにおいても40型のショートファイバーノブを有する

変異アデノウイルスにおいてはCARを介した感染が実質的に成立しないことが示された。

【0045】実施例11. F/40S-TAA改変ファイバー型組換えアデノウイルスAxCAZ3-F/40SasTAAの特性(I)

最初に、種々の腫瘍および正常細胞におけるNG2プロテオグリカン発現を以下のようにFACS解析により調べた。R-フィコエリスリン(PE)結合抗NG2モノクローナル抗体7.1(PN IM3454)およびPE結合対照IgG1(PN IM0670)をBeckman Coulter, Fullerton, CAから購入した。10cm²培養皿で増殖させたそれぞれの細胞をPBSで2回洗浄し、2%ウシ胎児血清を含む氷冷却PBS(2%FBS/PBS)に 10^5 /m1の密度で再懸濁した。次に各細胞を前述の2種の抗体 $20\mu\text{l}$ と氷上で30分間インキュベーションした。2%FBS/PBSで細胞を洗浄後、細胞をFACSスキャンにより、CellQuestソフトウェアを用いて、業者(Becton Dickinson, San Jose, CA)の指示書に従って解析した。その結果、NG2の発現はヒト悪性黒色腫細胞A375およびヒトグリオーマA172で高かったが、NG2は正常なヒトメラニン形成細胞の初代細胞、ヒト腎臓細胞株293、ヒト肺癌細胞A549、ヒト大腸癌細胞DLD-1およびヒト肝癌細胞株HLFでは発現しないことが明らかになった。(図11A~G)。

【0046】次に、改変ファイバー型組換えアデノウイルスAxCAZ3-F/40SasTAAが腫瘍を標的とした遺伝子導入をNG2陽性細胞に対して行うことができるかどうかを以下のようにして調べた。アデノウイルスAxCAZ3-F/wt、AxCAZ3-F/40SおよびAxCAZ3-F/40SasTAAのトランスダクション効率を比較するため、 $5 \sim 10 \times 10^4$ 個の細胞を37°Cにて30分間、各アデノウイルスと共にインキュベーションし、続いてPBSで洗浄して未結合ウイルスを除去し、その後、培地を添加した。37°Cにて18時間インキュベーション後、細胞を溶解して細胞ライセートを調製した。次に、化学発光レポーター遺伝子アッセイ(Galacto-Light Plus™, Tropix, Bedford, MA)により業者の指示書に従って各細胞ライセート中の β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

【0047】その結果、AxCAZ3-F/40SasTAAはNG2陽性細胞の遺伝子トランスダクションにおける効率を顕著に増加させることができた。NG2を発現するA375およびA172細胞においては、AxCAZ3-F/40SasTAAはAxCAZ3-F/40SまたはAxCAZ3-F/wtと比較して3~20倍程度高いトランスダクション効率を示した(図11H~N)。一方、NG2を発現しない293細胞、メラニン形成細胞、A549細胞、DLD-1細胞およびHLF細胞においては、AxCAZ3-F/40SおよびAxCAZ3-F/40SasTAAの遺伝子導入効率は非常に低いことが示され、一方、野生型ファイバーを有するAxCAZ3-F/wtの遺伝子導入効率は高いことが確認された(図11H~N)。この結果により、CARとの結合能をもつファイバーを有せず、かつ、ウイルスを構成しているCAR非認識型のファイバータンパク質にTAAレセプター(NG2)に特異的

に結合するリガンド(TAA)を接続した改変ファイバーを有するウイルスベクター粒子は、NG2を発現している細胞に対して特異的に感染することが示された。

【0048】実施例12. F/40S-TAA改変ファイバー型組換えアデノウイルスAxCAZ3-F/40SasTAAの特性(11)

NG2陽性腫瘍細胞である悪性脳腫瘍U251細胞に対するAxCAZ3-F/40SasTAAを調べた。NG2を発現している悪性黒色腫A375細胞と悪性脳腫瘍U251細胞、およびNG2を発現していないHeLa細胞を6穴プレートにまき、翌日10,000粒子/細胞で野生型(wt)アデノウイルス、および改変ファイバー型アデノウイルスAxCAZ3-F/40S、AxCAZ3-F/40SasTAAを感染させ、48時間後にマーカーであるLacZ遺伝子の発現をX-gal染色し、位相差顕微鏡で観察した。また、前述したように β -Gal Reporter GeneAssay-Chemiluminescentキット(Roche)を用いて相対的化学発光量(RLU)を測定した。その結果、F/wtおよびF/40S改変ファイバー型アデノウイルスと比較して、AxCAZ3-F/40SasTA A/Cについて約10倍高い感染が確認された。この結果により、ここでも、AxCAZ3-F/40SasTAAは、NG2を発現している悪性黒色腫A375細胞、悪性脳腫瘍U251細胞に対して腫瘍特異的感染することが確認された(図12)。

【0049】実施例13. in vivoにおける改変ファイバー型組換えアデノウイルスAxCAZ3-F/40SasTAAの感染特異性

in vivoで腫瘍細胞を標的化するために、NG2陽性A375細胞またはNG2陰性DLD-1細胞を保持するマウスに、AxCAZ3-F/wt、AxCAZ3-F/40Sおよび改変ファイバー型組換えアデノウイルスAxCAZ3-F/40SasTAAを静脈注射した後、in vivoにおけるそれぞれのアデノウイルスの組織分布を調べた。50 μ l(5 x 10⁶)のA375細胞またはDLD-1細胞をBALB/cAnNCjr-nu/nuマウスに皮下注射により移植した。約1000mm³の腫瘍を保持するマウスにPBS(n=1)またはAxCAZ3-F/wt(n=5)、AxCAZ3-F/40S(n=5)およびAxCAZ3-F/40SasTAA(n=8)を100 μ l(5 x 10⁶)粒子静脈注射した。マウスは4日後に犠牲にし、腫瘍中および種々の組織におけるLacZ活性を化学発光レポーター遺伝子アッセイ(Galacto-LightPlus™, Tropix, Bedford, MA)により業者の指示に従って測定した。PBSを注射したマウスのLacZ活性をバックグラウンドとして差し引いた。

【0050】その結果、AxCAZ3-F/40SasTAAの β -gal発現はマウスに移植したNG2陽性A375細胞では高かったが、AxCAZ3-F/wtまたはAxCAZ3-F/40Sの発現は非常に低いことが示された(図13A)。対照的に、NG2陰性DLD-1細胞をマウスに移植した場合は、腫瘍への遺伝子導入は、AxCAZ3-F/wt、AxCAZ3-F/40SおよびAxCAZ3-F/40SasTAAによっては起こらなかった(図13B)。一方、NG2陽性およびNG2陰性腫瘍を保持したマウスの肝臓において、AxCAZ3-F/wtはいずれにおいても高い導入遺伝子発現を示し、両者間で相違が無かった(図13A、13B)。また、AxCAZ3-F/40SおよびAxCAZ3-F/40SasTAAの肝臓における発現は、マウスに移植された腫瘍におけるNG2発現と関係なく非常に低かった(図13A、13B)。さらに、NG2陽性腫瘍を保持するマウスにおける肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓の各非腫瘍組織および血液中の導入遺伝子発現も調べた。図13Cに示したように、非腫瘍組織へのAxCAZ3-F/40SasTAAのトランスクレッション効率は非常に低く、野生型アデノウイルスと改変ファイバー型アデノウイルスとで有意な差はなかった。これらの結果は、再標的化された組換えアデノウイルスAxCAZ3-F/40SasTAAは、異種移植モデルにおいて、全身性投与後、NG2特異的に効率的なホーミングを行い、NG2陽性腫瘍細胞へ感染して遺伝子導入を行うが、正常組織には感染しないことを証明するものである。

【0051】実施例14. F/40SasK7改変ファイバー型組換えアデノウイルスの特性

実施例11と同様にして、CARとの結合能をもつファイバー有せず、ウイルスを構成しているCAR非認識型のファイバータンパク質にヘパラン硫酸に特異的に結合するリガンドを接続した改変ファイバーを有する組換えアデノウイルスAxCAZ3-F/40SasK7の特性を解析した。その結果、この組換えアデノウイルスはヘパラン硫酸含有レセプターを高発現している肺癌細胞A549細胞、悪性脳腫瘍U251細胞に対して腫瘍特異的感染をすることが示された(図14)。

【0052】

【発明の効果】本発明によれば、特定のレセプターを発現している細胞および/または組織に対して極めて特異性が高く、感染効率の高いアデノウイルスベクターあるいはアデノウイルス粒子を提供することができる。本発明のアデノウイルスベクターによれば、正常細胞および/または組織に対する有害な影響をほとんど与えることなく、特定のレセプターを発現している細胞および/または組織、特に腫瘍細胞および/または腫瘍組織を診断および/または治療することができる。本発明のアデノウイルスベクターは、そのような診断、治療目的に使用し得る医薬組成物を調製するために使用することができる。

【0053】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Hokkaido Technology Licensing Office Co., Ltd.<120> Adenovir

us vector

<130> Y1I0893<140>

<141>

21

22

<150> JP 2000-394521

<151> 2000-12-26

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2047

<212> DNA

<213> Human adenovirus type 40

<400> 1

tcgcgcgttt cggatqatqac qgtqaaaacc tctgacacat qcaqctcccq qaqqcqqtca 60
 caqcttqtc qtaaqcqqat qcqqqqaqca qacaqcccq tcaqqqcqcc tcaqcoqqtq 120
 ttqqcqggqtq tcqqqgqctq cttaactatq cqcatcaqa qcaqattqta ctqaqagtqc 180
 accatatqcg qtgtqaaata ccqacacat qcqtaaqqaa aaaataccqc atcaqgcqcc 240
 attcqcatt caqqctqcg aactgttqgg aaqqqgcqatc qqatqcgqcc ttctcqstat 300
 tacqccaqct qqcqaaaggg qqatqgtqctq caqqcqatt aaqttqgqta acqccagggt 360
 ttcccqtc acqacqttq aaaacgacqg ccagtqccaa qcttqcatqc ctqcaqqtq 420
 actctaqaqq atcccqcaqa gctqcaaaqaq cqgcqaaaaa tqatqatqgc aqcaqtttq 480
 qttacaqttq aatttqqaatq cctqcaqcg ttctttqcta accctcaaac actqcqcaaa 540
 qtcqaaqqaqt ccctqacta tqccctccq catqqctaq ttqtcqcaqcc ctqcaqatc 600
 tccaaqctaq aqctcaqcaa tctgatctct tacatggqca ttctacacga aaaccggctq 660
 qqqcaqaqacq ttcttcactq caccttqcaa qqqqaaqccc qccgaaqacta cqtcqcgac 720
 tqcatctatc ttttccctat ttcacqtcq caaaccqcta tqqqqgtctq qcaqcaqtc 780
 ttqqaqaqacq aaaacctcca qqaqcttaat aaattqctaq tacqaaqcccq tcqcaqactc 840
 tqqacqtc tttqacqtcq tacqgttqcc cqccqactq caaacctcat tttccqqaq 900
 cqqcttatqca aaacattqca aatqgttq ccaqacttq tcaqccaaq tatcttqcaa 960
 aacttqct ctttqact cqaqcttcc qqcatttqcc cqctatqaa ttqtcqttq 1020
 ccctccgatt ttgtccccct ctgctaccgc qaqtcccccc caccqttqg qatqactq 1080
 tacctccctc qtctaqccaa ctatqgtqcc caccactctq atcttqgaa aqactctaqc 1140
 qqcqacqqaqac tqctaqatq tcactqccq tcaqccctct qcacccctca tcqctactq 1200
 gtctgttaaca ccqgacttct tagqaaacc caqtaatqg ttagcttqg qattcaaggq 1260
 ccaqacqcaac aagaqaaqtc ttccagccctc aaactcacqg cqgcqttqg qacttccqcc 1320
 tacctacqca aatttattcc cqaqactat cacqcccacc aaattaaatt ttatqaaqac 1380
 caatcacgac ctcccaaagt ccccttaca qcctgtgtta tcacccaaag ccaaattctg 1440
 qcccaattac aqcttattca qcaqgcqct caqqaatttc ttttaaaaaa aqacacqgg 1500
 qtctatttqg accccccaaac cqgtqaaqaa cttaatacc cgtcactctc cqccqccqct 1560
 tcgtqccggtt cqcaqaaaca tqccacccaa qggaaacaqg catcccatcg cqcaacqgca 1620
 atccccqcaq aaactacaaa aqcaqgtqggg cqqgaaqgqg acqgtqggacq acqcccaqgc 1680
 agqgaaqgtt tcagacqgqg aggccqgagga qcaqatqggg agctqggaca qcctagacga 1740
 qgaggaccta qgqgacqtcq qgqgaaqaaac catcqccacq qacaqgqac catcttcaa 1800
 aaaaccqgtt cqgqgacqcaac ctccqaaaac tatcccqccc ctgcccaccgc aaccatqttc 1860
 actgaaagcc aqccgtqgtt qggacaccgt ctccatqcc qgatqgccaq caqcccaqgc 1920
 tqgtaaqcaq cctaaqcqcg cacqacqggg atactqctcc tqgqgacqccc ataaaqcaa 1980
 tattqtcgca tqccctccacq actqccqggg caatatctca ttcqacqcc qttacttqct 2040
 ttttca
 <210> 2
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

23

24

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 2

ccqqaattcq qtaccqqcct ccaatttqac aataacqqac qcatt

45

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 3

cqcqgatctt tattqttcaq ttatqtaqca aaatac

36

<210> 4

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 4

cqqaattctc qaqttacact ttttcataca ttqccaaqa ataaqqatcc acqcqtqtcq 60

acaagaataa aqaatcqttt qtqtt

85

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 5

cqqaattcq taccqqaqq tqqtqatta c

31

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 6

ggcctttact tqtttacgc

20

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 7

gatagaccat atggtagct tattttttt ttt

33

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

25

26

<400> 8
tcactaccat atqqtctatc tcgcctacqc
<210> 9
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
<400> 9
cacqqatcc tattqttcaq ttatqtaqca aaatac
<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:AS linker
<400> 10
Pro Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Pro Gly
1 5 10
<210> 11
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
<400> 11
ccqqaattca qatctccatc aqcctccqca tctqcttcc
39
<210> 12
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
<400> 12
cqqaattcat ggcqccatgt ttaatcaqag qt
<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:alpha MSH
 receptor binding peptide
<400> 13
Thr Ala Ala Ser Gly Val Arg Ser Met His
1 5 10
<210> 14
<211> 86
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

27

28

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
<400> 14
cqaqatctqq ttcaqqcaqt qqatccqqat ctacaqctqc aaqtqqtqtt cqaaqtatqc 60
actaaqtcqa caagaataaa qaatcq 86
<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
<400> 15
ctqtccaact tqcqqttqct caac 24
<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:integrin
binding peptide
<400> 16
Ala Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly
1 5 10
<210> 17
<211> 89
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
<400> 17
cqagatctgg ttctqqatct qqatccqqat ctccctgtqa ctgccqcgaa gactqttct 60
gtqgtaatcg cgacaagaat aaaqaatcq 89
<210> 18
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
<400> 18
cqagatctgg ttcaaggcagt ggatccggat ctaaaaqaa qaaaaaqaag aaqtaatcq 60
acaqaataaa aqaatcq 77

【図面の簡単な説明】

【図1】 プラスミドpsKII+6.7R-2t/40Fの構築過程を示した図である。

【図2】 Ad40ショートファイバーを増幅するためのプライマーの位置をプラスミドpsKII+6.7R-2t/40Fの制限酵素地図と共に示した図である。

【図3】 プラスミドpsKII+6.7R-2t/40Sの構造を示し

た図である。

【図4】 プラスミドpWE6.7R-40Sの構造、およびコスミドpWEAxDM-F/40Sの構築過程を示した図である。

【図5】 アデノウイルス5型ファイバーをコードする領域の一部を増幅するためのプライマーの位置を示した図である。

50 【図6】 アデノウイルス40型ショートファイバーをコ

ードする領域の一部を増幅するためのプライマーの位置を示した図である。

【図7】 プラスミドpSKII+540FS(NdeI)の構築過程を示した図である。

【図8】 コスミドpWE6.7R-540S(NdeI)の構造、およびコスミドpWEAxKM-F/540S(NdeI)の構築過程を示した図である。

【図9】 プラスミドpNEB/TAA、pNEB/RGD、pNEB/K7の構造およびそれらの構築過程を示した図である。

【図10】 プラスミドpWE6.7R-40SasTAA、pWE6.7R-40SasRGD、pWE6.7R-40SasK7の構造、およびコスミドpWEAxKM-F/40SasTAA、pWEAxKM-F/40SasRGD、pWEAxKM-F/40SasK7の構築過程を示した図である。

【図11】 A-G: FACSによって解析した、ヒトメラノーマ細胞A375、ヒトグリオーマ細胞A172、正常ヒトメラニン形成細胞の初代細胞、ヒト腎臓細胞株293、ヒト肺癌細胞A549、ヒト大腸癌細胞DLD-1およびヒトHLF肝癌細胞株（AからGの順）におけるNG2の発現を示す。

H-N: ヒトメラノーマ細胞A375、ヒトグリオーマ細胞A172、正常ヒトメラニン形成細胞の初代細胞、ヒト腎臓細胞株293、ヒト肺癌細胞A549、ヒト大腸癌細胞DLD-1およびヒトHLF肝癌細胞株（HからNの順）における、AxCAZ3-F/wt (□)、AxCAZ3-F/40S (斜線)、AxCAZ3-F/40SasTAA (■) による遺伝子トランスクレプションにおける効率 *

* を示す。

【図12】 F/40S-TAA改変ファイバー型組換えアデノウイルスAxCAZ3-F/40SasTAAによる腫瘍標的化遺伝子導入の結果を示したものである。縦軸は相対発光量(RLU)を表す。

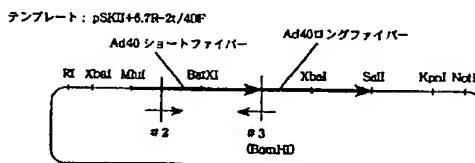
【図13】 (A) NG2陽性A375細胞を保持するマウスにAxCAZ3-F/wt、AxCAZ3-F/40SおよびAxCAZ3-F/40SasTAAをそれぞれ静脈注射した場合のin vivoにおける各アデノウイルスの分布。縦軸はLacZ活性の化学発光レポーター遺伝子アッセイにおける相対発光量(RLU)を表す。

(B) NG2陰性DLD-1細胞を保持するマウスにAxCAZ3-F/wt、AxCAZ3-F/40SおよびAxCAZ3-F/40SasTAAをそれぞれ静脈注射した場合のin vivoにおける各アデノウイルスの分布。縦軸はLacZ活性の化学発光レポーター遺伝子アッセイにおける相対発光量(RLU)を表す。

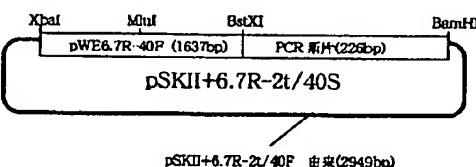
(C) AxCAZ3-F/wt、AxCAZ3-F/40SおよびAxCAZ3-F/40SasTAAをそれぞれ静脈注射した場合の、in vivoにおける各アデノウイルスの非腫瘍組織における分布。縦軸はLacZ活性の化学発光レポーター遺伝子アッセイにおける相対発光量(RLU)を表す。

【図14】 F/40S-K7改変ファイバー型組換えアデノウイルスAxCAZ3-F/40SasK7による腫瘍標的化遺伝子導入の結果を示したものである。縦軸は相対発光量(RLU)を表す。

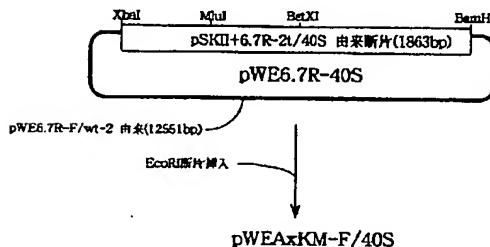
【図2】



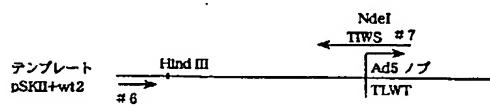
【図3】



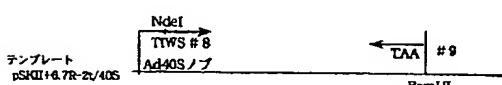
【図4】



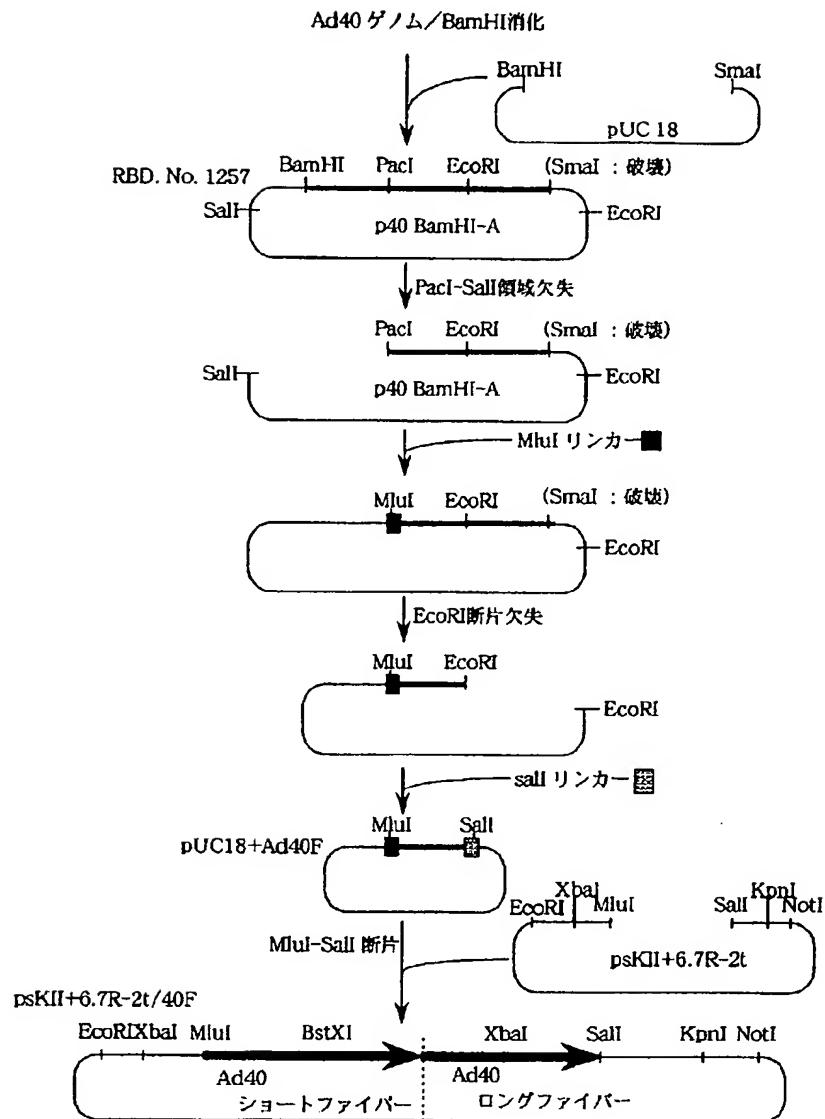
【図5】



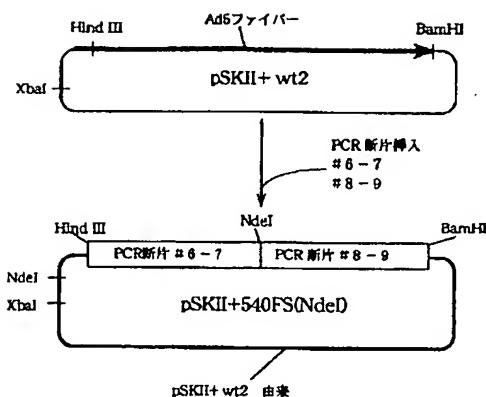
【図6】



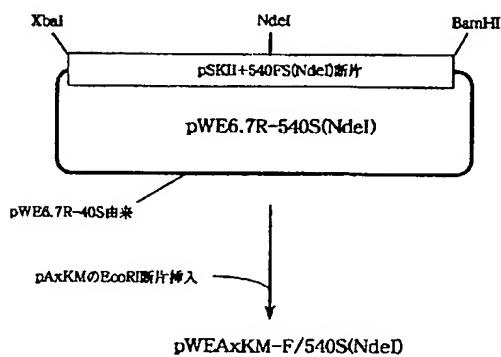
【図1】



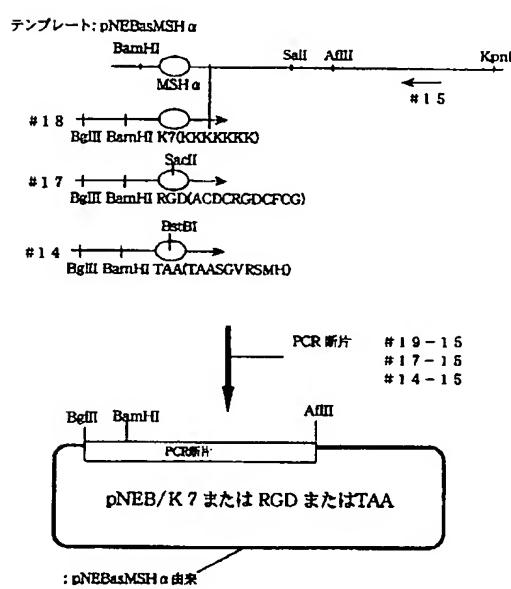
[図7]



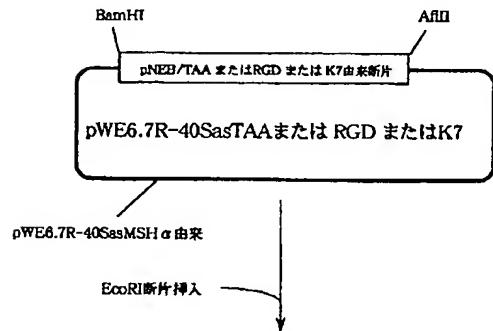
[図8]



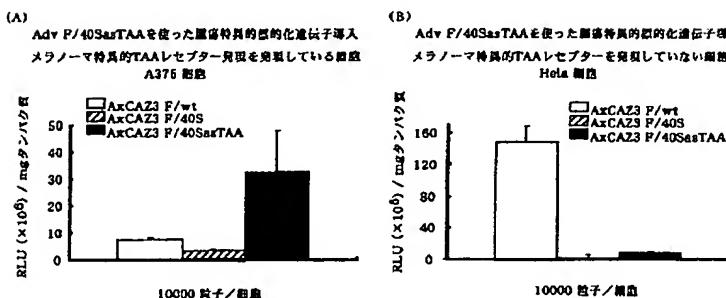
[図9]



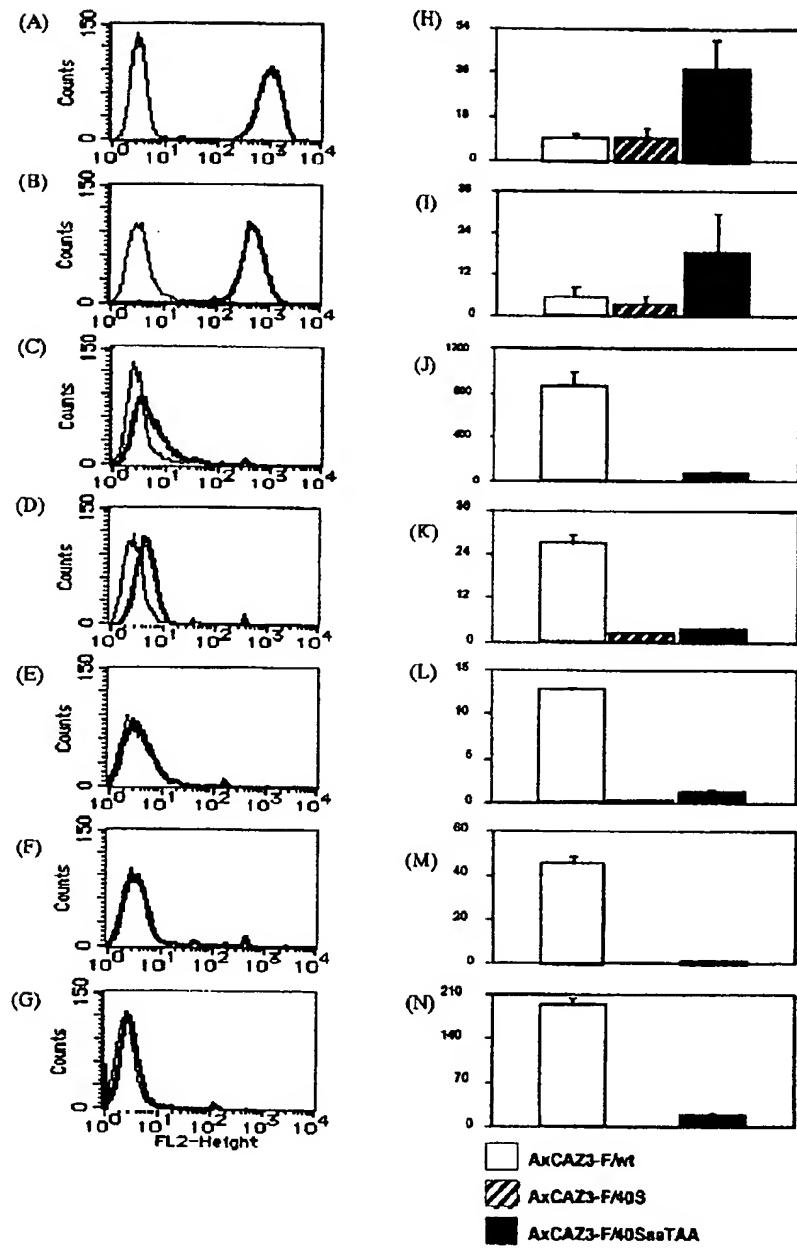
[図10]



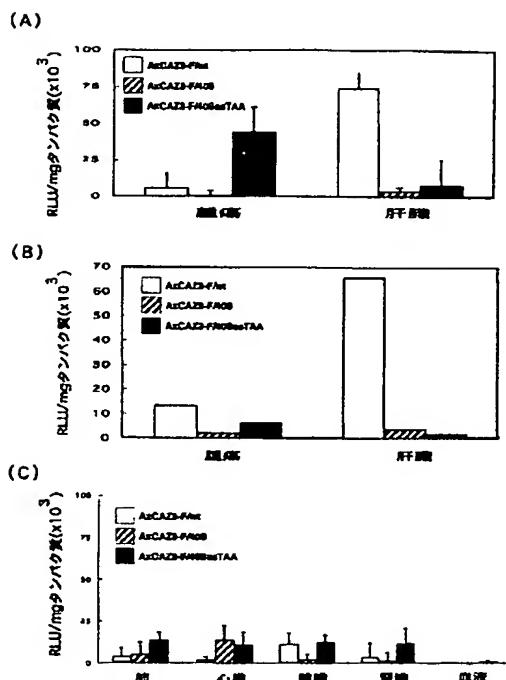
[図12]



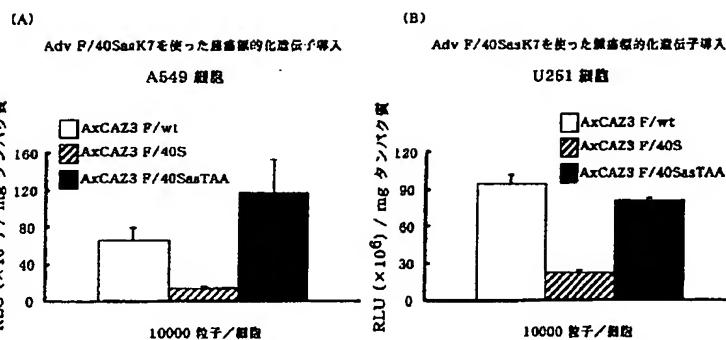
[図11]



【図13】



【図14】



フロントページの続き

(51)Int.C1.†	識別記号	F I	テマコード(参考)
A 6 1 K	38/00	A 6 1 P	4 H 0 4 5
	48/00	C 1 2 R	1:93
A 6 1 P	35/00	C 1 2 N	15/00
(C 1 2 N	7/00		Z N A A
C 1 2 R	1:93)	A 6 1 K	37/02

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA32 CA04 DA02
EA02 FA02 GA11 HA17
4B065 AA90X AA95X AA95Y AB01
AC20 BA02 CA45
4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA17
BA18 CA01 CA53 DA27 NA14
ZB26
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04
NA14 ZB26
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14
ZB26
4H045 AA10 AA20 BA10 CA01 DA86
EA28 FA74